

## 范 福順 氏から学位申請のため提出された論文の審査要旨

## 題 目

Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-binding protein2 and myosin-VIIa

(Exophilin-8は、RIM-BP2とミオシンVIIaを介して分泌顆粒を皮質アクチン網へと集積させる)

学位論文 (Thesis)

## 発表予定論文

Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-binding protein2 and myosin-VIIa

Nature Communications (投稿中)

Fushun Fan, Kohichi Matsunaga, Hao Wang, Ray Ishizaki, Eri Kobayashi,

Hiroshi Kiyonari, Yoshiko Mukumoto, Katsuhide Okunishi, and Tetsuro Izumi

## 論文の要旨及び判定理由

調節性分泌とは、内分泌細胞や神経細胞等が特定の刺激を感知して生理活性物質等を細胞外に放出することである。その破たんは、膵β細胞からのインスリン分泌不全による糖尿病のような、様々な疾患の原因となる。Exophilin-8 (MyRIP, Slac2-cとも呼ばれる) は、Rab27 small GTPaseと、アクチンおよびそのモーターたんぱく質ミオシンVaまたはVIIaと結合することが知られており、所属研究室では、膵β細胞でインスリン顆粒を細胞深部から細胞膜近傍の皮質アクチン網にリクルートすることを明らかにしている(Mol. Biol. Cell 22:1716-26 2011)。しかしながらその詳細な分子メカニズムや機能的意義については、依然不明な点が多い。また、これまで、他のグループの研究も含め、Exophilin-8に関する知見は培養細胞株で得られたものがほとんどで、実際に生体内でどのような機能を有するかは全く不明である。

本研究では、まず、Exophilin-8ノックアウトマウスを作製し、in vivoにおける機能を解析した。その結果、Exophilin-8ノックアウトマウスは、個体レベルで耐糖能が低下し、単離膵島灌流実験によって、グルコース刺激依存性インスリン分泌が第一相、第二相共に低下していた。次に、Exophilin-8を介したインスリン顆粒膜輸送の分子機構を調べるため、結合たんぱく質の探索を行ったところ、RIM-BP2を同定した。RIM-BP2は、膵β細胞内でExophilin-8と複合体を形成し、インスリン顆粒、特にアクチン網が豊富な細胞辺縁のコーナー部分に存在する顆粒に多く局在することがわかった。また、膵β細胞にRIM-BP2を強制発現させると、グルコース刺激依存性インスリン分泌量を増大させた。RIM-BP2との結合に必要なExophilin-8領域を特定して、RIM-BP2と結合できないExophilin-8変異体を作製し、ノックアウトマウス由来の膵島に発現させるレスキュー実験を行った。その結果、本変異体は、野生型を入れ戻した場合と異なり、インスリン分泌減弱を回復させることができなかった。このことから、RIM-BP2は、Exophilin-8のインスリン分泌促進作用に必要であることが示された。次にラット膵β細胞株INS1 832/13細胞において、Exophilin-8、RIM-

BP2それぞれsiRNAを用いてノックダウンさせると、グルコース刺激誘導性のインスリン分泌が著しく減少した。また、この細胞に対して抗インスリン抗体で免疫染色を行ったところ、Exophilin-8, RIM-BP2いずれのノックダウンでも、細胞辺縁コーナー部分に集中したインスリン顆粒が消失することがわかった。さらに、Exophilin-8-RIM-BP2複合体に結合するたんぱく質を詳細に探索したところ、ミオシンVIIaがRIM-BP2を介してExophilin-8と複合体を形成していることがわかった。ミオシンVIIaをノックダウンすると、インスリン分泌減少および細胞辺縁部インスリン顆粒消失が認められた。これまでは、膵β細胞内でExophilin-8はミオシンVaと直接結合し、インスリン顆粒膜輸送を制御していると報告されてきたが、本結合は通常の生理的条件下では観察できず、ミオシンVaをノックダウンしても、インスリン分泌の減少は見られるものの、細胞辺縁部インスリン顆粒は集積したままであった。以上のことから、Exophilin-8-RIM-BP2-ミオシンVIIa複合体が、主として顆粒を細胞辺縁アクチン網に集積させていることがわかった。本複合体は、顆粒の開口放出を惹起・促進させるCa<sup>2+</sup>チャネルやRIM, Munc13をも集積させる作用があることから、アクチン網内の顆粒の開口放出を促進させる機能があることも示唆された。以上の結果から、Rab27エフェクターExophilin-8は、新規複合体Exophilin-8-RIM-BP2-ミオシンVIIaの形成を介して、インスリン顆粒を細胞膜近傍の皮質アクチン網に集積させ、その後のインスリン分泌を効率的に促進させるのに必要なたんぱく質であることが示された。

当該論文は、Rab27エフェクターであるExophilin-8が、膵β細胞で重要な役割を持っていることを、世界で初めてin vivoで示したもので、さら未報告の新規Exophilin-8複合体を発見し、インスリン分泌に関する新たな分子機構を明らかにしたものであり、博士（医学）の学位に値するものと判定した。

(2017年2月10日)

#### 審査委員

主査	群馬大学教授（生体調節研究所）			
細胞構造	分野担任	佐藤 健	印	
副査	群馬大学教授（生体調節研究所）			
分子糖代謝制御	分野担任	藤谷 与士夫	印	
副査	群馬大学教授（生体調節研究所）			
代謝エピジェネティクス	分野担任	稲垣 毅	印	

## 最終試験の結果の要旨

Exophilin-8の新規結合たんぱく質であるRIM-BP2の機能と、インスリン顆粒開口放出と皮質アクチン網の関係について試問し、満足すべき解答を得た。

(平成29年2月10日)

## 試験委員

群馬大学教授（生体調節研究所）

遺伝生化学分野

担任

泉 哲郎

印

群馬大学教授（生体調節研究所）

細胞構造分野

担任

佐藤 健

印

## 試験科目

主専攻分野

遺伝生化学

A

副専攻分野

細胞構造学

A

## 1. Exophilin-8の新規結合たんぱく質であるRIM-BP2についての、膵β細胞内でのインスリン分泌における機能と生理的意義

RIM-binding protein2 (RIM-BP2), a novel exophilin-8 interacting protein, is essential for both peripheral accumulation and efficient exocytosis of granules. In addition, through RIM-BP2, exophilin-8 indirectly interacted with myosin-VIIa. Meanwhile, RIM-BP2 also assembles the L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel (VDCC) Cav1.3, and the priming factors, RIM and Munc13-1, in  $\beta$ -cells. The exophilin-8-RIM-BP2-myosin-VIIa complex not only physically anchors granules to the actin cortex, but also functionally assembles molecules involved in their exocytosis. This newly identified complex acts as a physical and functional scaffold and provides a novel mechanism that replenishes and maintains a releasable pool of granules within the F-actin network beneath the plasma membrane.

## 2. 膵β細胞内でのインスリン分泌における皮質アクチン網の機能と生理的意義

Secretory granules generated at the trans-Golgi network (TGN) must somehow pass through the actin cortex before they fuse with the plasma membrane and, as such, the actin cortex may act as a barrier. However, F-actin networks and its motor proteins may also act as a positive regulator to function as a carrier to capture and/or transport granules to the vicinity of the plasma membrane in support of exocytosis. Based on these data, cortical actin may play a dual role in insulin exocytosis.